

農産廢資源의 利用에 關한 研究(第二報)

纖維素資化細菌의 分離 및 同定

裨 武·金 炳 弘
韓國科學技術研究所·應用微生物研究室

Studies on the Utilization of Agricultural Wastes

(Part 2) Isolation and Identification of Cellulose Utilizing Bacteria.

M. Bae and B.H. Kim

Applied Microbiology. Lab., Korea Institute of Science and Technology,
Seoul, Korea

(Received November 20 1973)

ABSTRACT

For the purpose of producing cellulosic single-cell protein from the agricultural wastes, 172 strains of cellulose-assimilating bacteria were isolated from 102 samples of rotten woods, compost soils, soils and so on by the enrichment culture technique. The isolates were examined for their ability to utilize cellulose as carbon source, and then six strains were screened by their strong cellulose assimilating ability and identified as follows;

1. Among six strains of bacteria screened, five strains were identified as species belonged to the genus *Cellulomonas* and the remainder to the genus of *Sporocytophaga*.
2. The isolated *Sporocytophaga* species was identified as *S. ellipsospora* because it has a ellipsoidal microcyst.
3. The isolated *Cellulomonas* species were identical to a strain of *C. fimi*, *C. aurcgena*, *C. gelida*, respectively and two strains to *C. flavigena*.
4. The isolated *C. aurogena* was proved to be a new variety because it has different characteristics of assimilating pentoses such as arabinose and xylose from the strain discribed in Bergey's Manual.

서 론

식물이 광합성하는 유기물의 약 1/3로 추정되는 cellulose는 화학적 및 효소학적 분해에 대하여 비교적 안정하므로 의류, 건축재, pulp 등에 이용되고 있다. 그러나 cellulose가 분해 및 산화되지 않으면 대기 중의 탄산 gas가 매년 cellulose로 고정되어 carbon cycle이 중단되고 지구상에 cellulose가 축적되어 식물이 생육하지 못할 것이므로 이를 분해하여 energy source로 생육하는 미생물이 자

연계에서 식물체를 분해하여 탄산 gas를 발생시키는 것으로 오래전부터 믿어져 왔다.

Cellulose를 분해 소화할 수 있는 미생물은 사상균에 많이 알려져 있으며 세균 중에는 초식동물의 장내 세균과⁽¹⁻²⁾ 호기성 세균 중에서 *Cellulomonas* 속, *Cellvibrio* 속, *Pseudomonas* 속, *Cytophaga* 속 및 *Sporocytophaga* 속의 세균들에서 알려져 있다.⁽³⁾

섭유소자화세균 및 이들의 섭유소 분해 효소에 관한 연구는 사상균에 비해 비교적 적은 편이다. 그 대표적인 것으로 King⁽⁴⁻⁶⁾ 등 및 Berg⁽⁷⁾ 등의

*Cellvibrio pilvus*의 cellulase에 관한 연구와 岡本 등⁽⁸⁾ 및 Nisizawa⁽⁹⁻¹¹⁾ 등의 *Pseudomonas fluorescense*의 cellulase에 관한 연구를 들 수 있다.

새로운 식량자원으로 미생물 균체가 mass doubling time이 고등생물에 비해 월등히 짧고 생산성이 높아 크게 각광을 받고 있다. 특히 석유 단체란 단백질의 경우 영국, 불란서 등 여러 나라에서 생산 단계에 있다. 이에 비해 섬유소단세포단백은 그 기질인 섬유소가 매년 식물에 의해 합성되므로 자원이 풍부하고 석유단세포단백에서 문제가 되고 있는 독성이 없으므로 여러가지 잇점이 있으나 cellulose 혹은 이를 함유하는 물질이 물용성이고 분해 속도가 늦어 비교적 최근에 연구가 시작되었으며 현재 활발히 진행되고 있다.

Han 등은 사탕수수 밭에서 분리한 *Cellulomonas* 속의 세균을 알카리 처리한 bagasse에서 배양하여 섬유소단세포단백을 생산할 수 있음을 보고하였고^(12,13) Updegraff 등은 cellulose를 자화하는 미생물을 자연계에서 분리하여 이들의 자화능을 신문지를 기질로 검색한 결과 *Myrothecium verrucaria*에 속하는 사상균의 1주가 가장 많은 단백질을 생산할 수 있음을 보고하고⁽¹⁴⁾ 이어서 확산 및 Michaelis-Menten의 법칙을 적용하여 섬유소 발효 중에 일어나는 현상을 규명하여 scale up에 필요한 자료를 얻었다⁽¹⁵⁾. Church 등은 섬유소 자화력이 있는 사상균을 식품가공 공장의 폐수에서 배양하여 섬유소단세포단백을 얻을 수 있음과 아울러 공장폐수를 처리할 수 있음을 보고하였다⁽¹⁶⁾.

본 연구에서는 우리나라 주농산물의 부산물인 짚류의 이용성을 높이고 국내 절대량이 부족한 단백질자료를 생산하기 위해 섬유소 자화세균에 의한 섬유소단세포단백의 생산을 목적으로 섬유소자화력이 강한 세균을 분리 동정하였다.

재료 및 방법

I. 섬유소 자화세균의 분리

섬유소자화세균 분리용 시료로 전국에서 채취한 썩은 나무, 퇴비, 토양 등을 분리용 배지[(NH₄)₂SO₄ 0.4%, NaCl 0.5%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.01%, CaCl₂ 0.01%, Yeast extract 0.1%, filter paper(Whatman no.1) 1×6m²/5ml]에서 enrichment culture하여 섬유소자화세균을 분리하였다. 즉, 시료 약 1g을 생리식염수에 연탁시키고 그 상등액 1ml를 분리용 배지 5ml를 넣은 시험관(28×280mm)에 접종하여 30°C

shaking incubator에서 배양한다. 배양 중 filter paper가 붕괴하면 새로운 배지 5ml에 배양액 1ml를 접종한다. 이러한 조작을 3~5회 반복하여 섬유소 자화력이 있는 세균은 증식시키고 자화력이 없는 세균은 도태시킨 후 섬유소자화세균 보존용 배지[pulp powder 1.0%, NaNO₃ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, KH₂PO₄ 0.02%, K₂HPO₄ 0.1%, yeast extract 0.02%, potato extract(Difco) 0.5%, agar 1.5%]에 streak culture하여 나타내는 독립 취락을 동일한 배지에 사멸 배양하였다.

II. 섬유소자화세균의 동정법

1. 형태학적 특징

1) 균체의 형태 및 크기 측정

공시균을 safranin 0로 염색하여⁽¹⁷⁾ 현미경(Olympus model FH)으로 관찰하고 필요하면 사진을 촬영하였다.

2) 운동성 검정

Flagella에 의한 운동성은 반유동 고층배지에 stab culture하여 검사하였으며⁽¹⁰⁾ gliding motility는 Skerman의 방법⁽¹⁸⁾으로 검정하였다.

3) Gram 염색

Hucker의 변법⁽¹⁷⁾으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다.

4) Microcyst 확인

2주 이상된 균을 80°C에서 10분간 열처리하여 사멸하지 않은 균을 Schaefer-Fulton의 spore 염색법⁽¹⁰⁾으로 염색하여 현미경으로 관찰하였다. Microcyst는 vegetative cell 중에 있는 bacterial spore와 달리 독립적으로 나타나므로 구별할 수 있다.

2. 배양학적 특징

상법으로⁽¹⁰⁾ gelatine 액화, 최적온도, 여과지 붕괴력 및 colony의 형태 등을 관찰하였다.

2. 생리학적 특징

상법으로⁽¹⁷⁾ 질산염 환원, protein, 당에 대한 대사 작용을 관찰하였으며 당의 산화적 혹은 발효적 분해에 관한 실험은 Skerman의 방법으로 하였다.

실험 결과

I. 섬유소자화세균의 분리

102종의 썩은 나무, 퇴비, 토양 등의 시료에서 여과지를 유일한 유기 탄소원으로 하는 배지에서 enrichment culture technique으로 172주의 섬유소자화세균을 분리하였다.

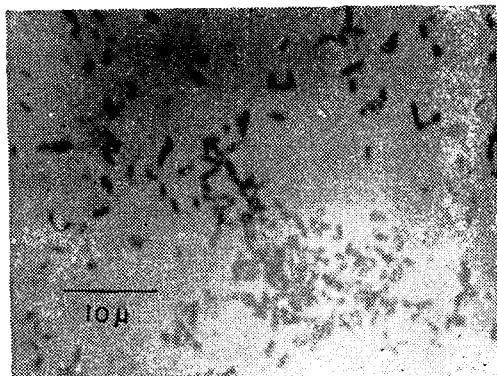


Photo. 1 *Cellulomonas fimi* KIST 124(×1,500)

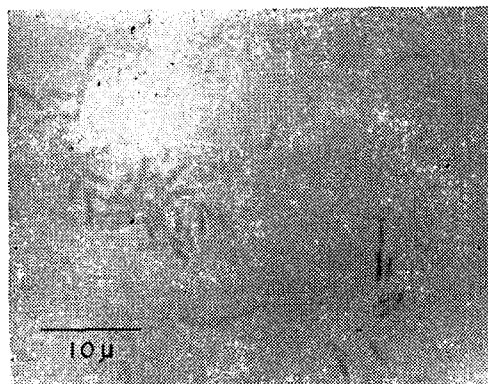


Photo. 4 *C. gelida* KIST 12(×1,500)

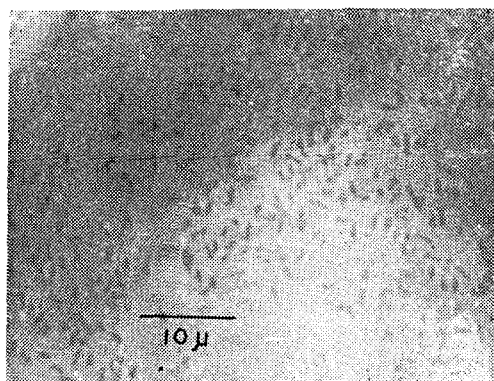


Photo. 2 *C. aurogena* nov. species KIST 11
(×1,500)

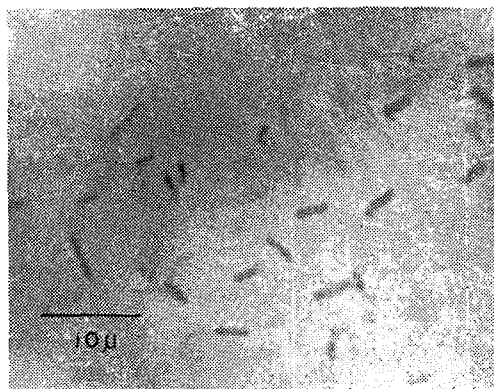


Photo. 5 *Sporocytophaga ellipsospora* KIST 56
young culture(×1,500)

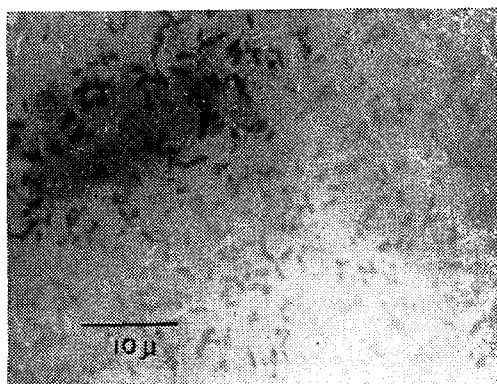


Photo. 3 *C. flavigena* KIST 321(×1,500)

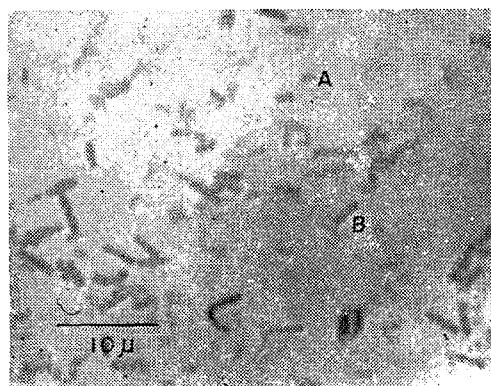


Photo. 6 *S. ellipsospora* KIST 56 old culture with
microcyst(×1,500)
A : Microcyst
B : Vegetative Cell

TABLE 1. Morphological and Cultural Characteristics of Isolated Cellulose-Assimilating Bacteria.

	KI 1B-2-4 (<i>Cellulomonas fimi</i> KIST 124)	J 3B-2-1 (<i>C. flavigena</i> KIST 321)	J 3B-2-2 (<i>C. flavigena</i> KIST 322)	J 1B-1 (<i>C. aurogena</i> nov. species KIST 11)	J 1B-2 (<i>C. gelida</i> KIST 12)	KW 5-6 (<i>Sporocytophaga elipsospora</i> KIST56)
Morphological Characteristics						
Form	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Size(μ)	0.5×1.8-2.5	0.5×1.5-2.0	0.5×1.5-2.0	0.5×1.3-1.6	0.5×1.5-2.5	0.5×2.5
Motility	+	-	-	+	+	Gliding
Gram Staining	±	±	±	-	±	-
Microcyst	-	-	-	-	-	ellipsoidal 0.5×1.3(μ)
Cultural Characteristics						
Agar Slant	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Ivory	white
Broth	Uniformly turbid	Uniformly turbid	Uniformly turbid	Uniformly turbid	Uniformly turbid	Pellicle
Gelatine liquefaction	+	+	+	+	+	+
Filter paper in peptone water	deg.	deg.	deg.	deg.	deg.	deg.
Optimum temperature	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C
Colony						
Form	Circular	Circular	Circular	Circular	Punctiform	Circular
Elevation	Covex	Covex	Covex	Umbonate	Covex	raised
Margin	entire	entire	entire	entire	entire	entire

Table 2. Physiological Characteristics of Isolated Cellulose-Assimilating Bacteria

	KI 1B-2-4 (<i>C. fimi</i> KIST 124)	J 3B-2-1 (<i>C. flavigena</i> KIST 322)	J 3B-2-2 (<i>C. flavigena</i> KIBT 322)	J 1B-1 (<i>C. aurogena</i> nov. species KIST 11)	J 1B-2 (<i>C. gelida</i> KIST 12)	KW 5-6 (<i>Sporocytophaga elipsospora</i> KIST56)
Starch hydrolysis	+	+	+	+	+	-
Nitrate Reduction	+	+	+	+	-	+
Fermentative or Oxidative break down of sugars	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.	Fer.
Indole	+	-	-	+	+	-
NH ₃	+	-	-	+	+	+
H ₂ S	-	-	-	+	+	+
Litmus Milk	Acid	Acid	Acid	Acid, Curd	Acid, Peptonized	Acid, Peptonized
Methylene Blue test	Red.	Red.	Red.	Red.	Red.	Red.
M. R. test	+	-	-	+	-	+
V. P. test	-	-	-	+	-	+
Catalase	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+

II. 섬유소자세균의 동정

분리한 섬유소자세균 172주 중에서 섬유소 자화력 및 섬유소단세포단백 생성량이 많은 세균 6주를 선별하고 이들을 동정하였다.

1. 형태학적 및 배양학적 특징

토양에서 분리한 KW 5-6, 썩은 나무에서 분리한 KI 1B-2-4, 산양솥에서 분리한 J 1B-1, J 1B-2 및 퇴비에서 분리한 J 3B-2-1, J 3B-2-2의 형태학적 및 배양학적 특징은 Fig 1~6 및 Table 1과 같다. 분리된 J 3B-2-2는 분리된 J 3B-2-1과 동일한 균주로 나타나 이의 사진은 제외하였다. 그림 6에서

Table 3. Carbohydrate Assimilation by the Isolated Cellulose-Assimilating Bacteria

	KI 1B-2-4 (<i>C. fimi</i> KIST 11)	J 3B-2-1 (<i>C. flavigena</i> KIST 321)	J 3B-2-2 (<i>C. flavigena</i> KIST 322)	J 1B-1 (<i>C. aurogena</i> nov. species KIST 11)	J 1B-2 (<i>C. gelida</i> KIST 12)	KW 5-6 (<i>sporocytophaga ellipsospora</i> KIST)
Glucose	A	A	A	A	A	A
Fructose	A	A	A	A	A	A
Mannose	A	A	A	A	A	A
Galactose	A	A	A	A	A	—
Rhamnose	A	A	A	A	A	A
Ribose	A	A	A	A	—	A
Arabinose	A	A	A	A	±	A
Xylose	A	A	A	A	±	—
Maltose	A	A	A	A	±	—
Sucrose	A	A	A	A	A	A
Lactose	A	A	A	A	A	A
Cellobiose	A	A	A	A	A	A
Raffinose	A	A	A	A	A	A
Sorbitol	A	A	A	A	A	±
Mannitol	—	—	—	A	—	—

보는 바와 같이 분리균 KW 5-6은 타원형의 Microcyst를 형성한다.

2. 생리학적 특징

또한 분리, 선별된 세균의 생리학적 및 당자화성은 Table 2 및 3과 같다.

이상에서 얻은 분리, 선별한 세균의 성질을 Hendrie⁽³⁾ 및 Skerman⁽¹⁸⁾이 기술한 섬유소자화세균의 특징을 비교하면 다음과 같다. 분리균 KW 5-6은 microcyst를 형성하고 gliding motility가 있으므로 *Sporocytophaga*속 세균으로 동정되며 나머지 분리균 5주는 모두 당을 발효적으로 분해하므로 *Cellulomonas*속 세균인 것으로 나타났다.

동정된 각 균주의 성질이 Bergey's Manual에 수록된 것과 서로 다르거나 Bergey's Manual에 수록되어 있지 않은 성질은 다음과 같다.

KI 1B-2-4 (*Cellulomonas fimi* KIST 124)

Bergey's Manual 중 *Cellulomonas*속의 분류표에서 운동성이 있고 질산염을 환원시키며 5탄당인 xylose와 arabinose를 자화하는 세균을 *C. fimi*로 분류하고 있으며 분리균 KI 1B-2-4는 이러한 성질이 일치한다. 분리된 *C. fimi*의 분류학상의 특징은 다음과 같다.

당에서 발효적으로 生酸

Methyl red test : 양성

Indole 생산 : 양성

H₂S 생산 : 양성

Litmus milk : 生酸

Methylene blue : 환원

Urease : 양성

Catalase : 양성

Mannose, Galactose, Rhamnose, Ribose, Maltose, Sucrose, Lactose, Cellobiose, Raffinose,

Sorbitol에서 gas 발생없이 生酸

Mannitol은 자화하지 못한다.

J 3B-2-1 (*Cellulomonas flavigena* KIST 321)

운동성이 없고 질산염을 환원시키므로 *C. flavigena*와 그 성질이 일치한다.

분리된 *C. flavigena*의 분류학상의 특징은 다음과 같다.

Methyl red test : 음성

Indole 생산 : 음성

H₂S 생산 : 음성

Litmus milk : 生酸

Methylene blue : 환원

Urease : 양성

Catalase : 양성

Fructose, Mannose, Galactose, Rhamnose, Ribose, Asabinose, Xylose, Cellobiose, Raffinose,

Sorbitol에서 gas 발생없이 生酸

Mannitol : 자화하지 않는다.

분리군 J 3B-2-2는 전술한 바와 같이 분리군 J 3B-2-1과 분류학 상의 특징이 일치하는 동일한 군으로 나타났다.

J IB-1(*Cellulomonas aurogena* nov. species KIST

11)

운동성이 있고 질산염을 환원시키며 Xylose와 Arabinose를 자화하는 성질이 *C. fimi*와 같으나 Gram 염색이 음성이며 NH₃ acetyl-methyl carbinol을 생산하는 성질이 *C. fimi*와 다르고 *C. aurogeua*와 같으므로 분리군 J IB-1은 *C. aurogena*의 새로운 변종으로 생각된다.

분리한 *C. aurogena* nov species의 분류학적 특징은 다음과 같다.

Methye Red test : 양성

Indole 생산 : 양성

H₂S 생산 : 양성

Litmus Milk : 산을 생산하고 curd 형성

Methylene Blue : 환원

Urease : 양성

Catalase : 양성

Fructose, Mannose, Galactose, Rhamnose, Ribose, Arabinose, Xylose, Cellobiose, Raffinose, Sorbitol 및 Mannitol에서 Gas 발생없이 生酸

J JB-2(*Cellulomonas gelida* KIST 12)

운동성이 있고 질산염을 환원시키지 못하며 할겐배지 상에서 ivory 색으로 나타나는 성질이 *C. gelida*와 일치한다.

분리한 *C. gelida*의 분류학적 특징은 다음과 같다.

Methyl Red test : 음성

Inole 생산 : 양성이나 약하다

H₂S 생산 : 양성

Litmus Milk : 生酸. curd 형성 후 peptone 화

Urease : 양성

Catalase : 양성

Fructose, Mannose, Galactose, Rhamnose, Arabinose, Xylose, Cellobiose, Raffinose, Sorbitol에서 生酸

KW 5-6(*Sporocytophega ellipsospora* KIST 56)

Microcyst가 타원형이므로 *S. ellipsospora*와 성질이 일치한다. Bergey's Manual에는 *Sporocytophaga*속 세균의 분류학상의 특징이 거의 수록되어 있지 않고 있다. 분리한 *S. ellipsospora*의 분류학

적 특징은 다음과 같다.

당에서 산화적으로 生酸

Gram 염색 : 음성

운동성 : Gliding

액체배양 : pellicle을 형성하여 표면발육

Gelatine 액화 : 양성

진분 분해 : 음성

Methyl Red test : 양성

V. P. test : 양성

NH₃ 생산 : 양성

Indole 생산 : 음성

H₂S 생산 : 음성

Litmus Milk : 生酸. peptone 化

Urease : 양성

Catalase : 양성

Glucose, Fructose, Mannose, Rhamnose, Ribose, Arabinose, Sucrose, Lactose, Cellobiose 및 Raffinose에서 gas 발생 없이 生酸하고 Galactose, Xylose, Maltose, Sorbitol 및 Mannitol은 자화되지 않았다.

이상의 분리군들을 *Cellulomonas fimi* KIST 11 (KI IB-2-4) *C. flavigena* KIST 321(J 3B-2-1), *C. flavigena* KIST 322(J 3B-2-2), *C. aurogena* nov. species KIST 11(J IB-1), *C. gelida* KIST 12(J IB-2), *C. 및 Sporocy tophaga ellipsospora* KIST 56(KW 5-6)으로 명명하고 이들을 이용한 동산폐자원에서의 섬유소단세포단백 생산에 관하여 계속 보고하고자한다.

要 約

농산폐자원을 기질로 하여 섬유소단세포단백을 생산하기 위해 전국에서 수집한 썩은 나무, 퇴비, 토양 등 시료에서 enrichment culture technique으로 172주의 섬유소자화세균을 분리하였다. 이들중 섬유소 자화력이 강한 군 6주를 동정하여 다음 결과를 얻었다.

1. 선별한 6주 중 5주는 *Cellulomonas*속이었고 나머지 1주는 *Sporocytophaga*속이었다.

2. *Sporocytophaga*속의 세균은 microcyst가 타원형인 *S. ellipsospora*이었다.

3. *Cellulomonas*속의 세균들은 *C. fimi* 1군주, *C. gelida* 1군주, *C. flavigena* 2군주 및 *C. aurogena* 1군주이었다.

4. 분리군 *C. aurogena*는 5탄당인 arabinose와 xylose를 자화하는 성질이 Bergey's Manual에

수록된 균과 달라 새로운 변종으로 판명되었다.

參 考 文 獻

- (1) Ayers, W. A: *J. Bacteriol*, **76**, 504(1958)
- (2) Leatherwood, J. M: *Appl Microbiol*, **13**, 771 (1965)
- (3) Gibbs, B. M. and D. A. shadton; Identification Methods for Microbiologists, Part B Academic Press, New York(1968)
- (4) Hulcker, F. H. and K. W. King: *J. Bacteriol*, **76**, 565(1958)
- (5) Strovick, W. O., F. F. Cole and K. W. King: *Biochem* **2**, 1106(1963)
- (6) Strovick, W. O., and K. W. King: *J. Biol Chem*, **235**, 303(1960)
- (7) Berg, B., B. v Hofsten and Pefferon: 4th Internat. Ferment. Symp. Abst. 138(1972)
- (8) 岡本辰夫·朝井勇宣: 日農化誌, **26**, 137(1952)
- (9) 山根國男·鈴木 恕·山口和男·塚田美重子·西澤一俊: 日釀工誌, **43**, 72(1965)
- (10) Shibata, Y. and K. Nisizawa: *J. Ferment. Technol.* (Japan) **47**, 573(1969)
- (11) Yamane, K., H. Suzuki and K. Nisizawa: *J. Biochem*(Tokyo) **63**, 19(1970)
- (12) Han, Y. W. and V. R. Srinivasan: *Appl. Microbial*, **16**, 1140(1968)
- (13) Han, Y. W., C. E. Dunlap and C. D. Callihan: *Food Technol*, **25**, 130(1971)
- (14) Updegraff, D. M.: *Biotech. Bioeng.*, **XIII**, 77 (1971)
- (15) Updegraff, D. M. and Ross, L. W.: *Biotech. Bioeng.*, **XIII**, 99(1971)
- (16) Church, B. D., C. E. Erickson and C. M. Widmer: *Food Technol.* **27**(2), 36(1973)
- (17) Society of American Bacteriologists: Manual of Microbiological Methods, McGraw-Hill New York (1957)
- (18) Skerman, V. B. D.: A Guide to the Identification of the Genera of Bacteria, 2nd ed, the Williams and Wilkins, Baltimore(1967)
- (19) Breed, R. S., E. G. D. Murry and N. R. Smith: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 7th ed, the Williams and Wilkins Baltimore (1957)